

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

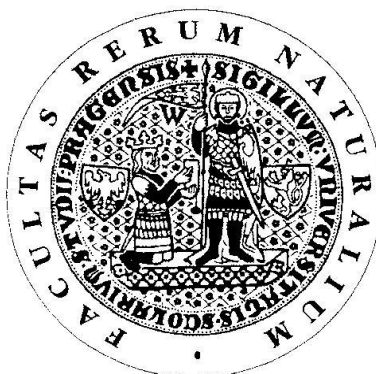
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí

Fytoextrakce nesteroidních analgetik

Phytoextraction of nonsteroidal analgesics



Bakalářská práce

Bažilová Blanka

2012

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Katedra organické a jaderné chemie PřF UK

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odbornou pomoc a velkou trpělivost. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Šárce Pšondrové za věcné připomínky a dobré vedení.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že řádně cituji všechny převzaté informace a skutečnosti.

V Praze dne 25. 5. 2012

Bažilová Blanka

ABSTRAKT

Životní prostředí je v současné době značně znečištěno řadou různorodých polutantů a to hlavně kvůli lidské činnosti. Část této práce pojednává o problému šíření kontaminantů do životního prostředí. Dále pak shrnuje určité možnosti odstraňování xenobiotik z odpadních a podzemních vod, a zaměřuje se v největší míře na nové inovativní metody dekontaminace znečištěných oblastí založených na rostlinných biotechnologiích. Tato studie zahrnuje znalosti o schopnostech a využití rostlin při transformaci a degradaci nesteroidních analgetik, které patří mezi nejběžnější a masově používaná léčiva.

Cílem bakalářské práce bylo sledování osudu a transportu v dnešní době používaných nesteroidních analgetik a zhodnocení účinnosti fytoextrakce těchto látek z kapalného živného media pomocí slunečnice roční a kukuřice seté.

Pro stanovení vybraných nesteroidních analgetik (piroxikam, nimesulid, ketoprofen a paracetamol) byl vyvinut a optimalizován analytický postup, který sestával z extrakce a stanovení pomocí metody HPLC-MS.

Výsledky naznačují, že studovaná nesteroidní analgetika jsou velmi dobře rostlinami extrahována. Největší fytoimediační potenciál byl prokázán pro ketoprofen, který byl přijímán rostlinami více než ostatní nesteroidní analgetika.

Klíčová slova:

Fytoremediace, nesteroidní analgetika, příjem rostlinami, znečištěné oblasti

ABSTRACT

In present time environment is considerably contaminated by various diversified pollutants mainly because of human activity. Part of this dissertation deals with problem of contaminants spreading into environment. Further more it summarizes particular options of xenobiotics removal from waste and subterranean waters and it mostly focuses on new innovative methods decontamination methods of polluted areas based on vegetative biotechnologies.

This study comprises knowledge about plants abilities and usage by transformation and degradation of nonsteroid analgesics, which belong to most common and mass used drugs. Goal of dissertation was to observe fate and transport in present time used nonsteroid analgesics and phytoextraction efficiency evaluation of such substances from liquid nutrient medium with sunflower and corn.

For determination of chosen nonsteroid analgesics (piroxicam, nimesulid, ketoprofen and paracetamol) was developed and optimized analytical procedure which consisted of extraction and determination by HPLC-MS method.

Results indicate that studied nonsteroid analgesics are very good extracted by plants. Biggest phytoremediation potential was proved for ketoprofen, which was consumed by plants more than other nonsteroid analgesics.

Keywords:

Phytoremediation, nonsteroid analgesics, consumption by plants, polluted areas

SEZNAM POUŽITÝCH ZKTRATEK

ČOV – čistírna odpadních vod

HPL – vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

LOD – mez detekce

COX – cyklooxygenasa

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

MTBE – methyl-terc-butyl-ether

TPH – ropné látky

PAH – polyaromatické uhlovodíky

PCB - chlorované alifatické uhlovodíky

TCE - aromatické uhlovodíky

NSAID – nesteroidní protizánětlivé látky (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)

NSAF – nesteroidní antiflogistika

OBSAH

1. ÚVOD	- 7 -
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	- 8 -
3. FARMAKA V EKOSYSTÉMU	- 9 -
4. FYTOREMEDIACE	- 11 -
4. 1 Rozdělení fytoředivačních technik	- 12 -
4.1.1 <i>Fytoextrakce (fytoakumulace)</i>	- 13 -
4.1.2 <i>Fytostabilizace</i>	- 14 -
4.1.3 <i>Fytovolatilizace</i>	- 14 -
4.1.4 <i>Fytodegradace</i>	- 15 -
4.1.5 <i>Rhizodegradace (fytořtimulace)</i>	- 15 -
4.1.6 <i>Rhizofiltrace</i>	- 16 -
4. 2 Výhody a nevýhody fytoředivačních	- 16 -
5. NESTEROIDNÍ ANALGETIKA	- 18 -
5. 1 Piroxikam	- 19 -
5. 2 Nimesulid	- 20 -
5. 3 Ketoprofen.....	- 21 -
5. 4 Paracetamol	- 22 -
6. METABOLISMUS ORGANICKÝCH LÁTEK V ROSTLINNÝCH BUŇKÁCH	- 24 -
6. 1 Metabolické aspekty fytoředivače	- 24 -
6. 2 Fytotřtransformace.....	- 24 -
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 26 -
7.1 Použitý materiál.....	- 26 -
7.1.1 <i>Chemikálie</i>	- 26 -
7.1.2 <i>Rostlinný materiál</i>	- 26 -
7.1.3 <i>Přístroje</i>	- 26 -
7.2 Příprava in vitro kultur	- 27 -
7.3 Fytoextrakce piroxikamu, nimesulidu, ketoprofenu a paracetamolu	- 28 -
8. VÝSLEDKY A DISKUZE	- 28 -
9. ZÁVĚR	- 36 -
10. PŘÍLOHY	- 37 -
11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 42 -

1. ÚVOD

Fytoremediace je alternativní, vysoce inovativní metoda, využívaná od roku 1991, která zahrnuje široké spektrum postupů, při nichž dochází s pomocí rostlin k odstranění toxických látek z životního prostředí. Tento postup odstraňování jak organických, tak i anorganických kontaminantů využívá tzv. přirozenou atenuaci. Přirozená atenuace je založená na běžných metabolických dějích, které se odehrávají v rostlinných, popřípadě mikrobiálních buňkách. Z anorganických sloučenin rostliny bezpodmínečně potřebují přijímat anorganické ionty a stopové prvky. Mechanismy příjmu těchto látek umožňují rostlinám v určitém množství přijímat i ionty toxických těžkých kovů a hromadit je v tkáních ve vhodných formách, čímž se snižuje jejich toxicita. U organických sloučenin je tento mechanismus poněkud odlišný. V tomto případě mohou rostliny akumulovat organické sloučeniny v nezměněné formě nebo je transformovat na nefytotoxické metabolity, které se kumulují v různých místech buňky.

Tento proces přírodního snižování kontaminace je definován jako soubor dějů přirozeně se vyskytující v životním prostředí, které bez lidského zásahu vedou k významnému snížení množství toxicity a celkové koncentrace kontaminantů. Odstraňování kontaminantů z životního prostředí je založeno na zachytu těchto látek do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně zlikvidovány, plochy opětovně osázeny rostlinami do té doby, než se koncentrace toxických látek sníží na přijatelnou hodnotu.

Fytoremediace je stále ve vývojovém stádiu, sama tato metoda nemůže být ještě vnímána jako hlavní technologie v širokém měřítku, ale přesto již byla použita v mnoha případech k dekontaminaci půd a povrchových vod.

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo studium reziduí farmak ze životního prostředí pomocí biotechnologických metod, sledování osudu a transportu v současné době hojně používaných léčiv proti bolesti nevázaných na lékařský předpis. Práce se zaměřuje na studii účinnosti extrakce nesteroidních analgetik (piroxikam, nimesulid, ketoprofen, paracetamol) z média kultivovaných sterilních rostlin.

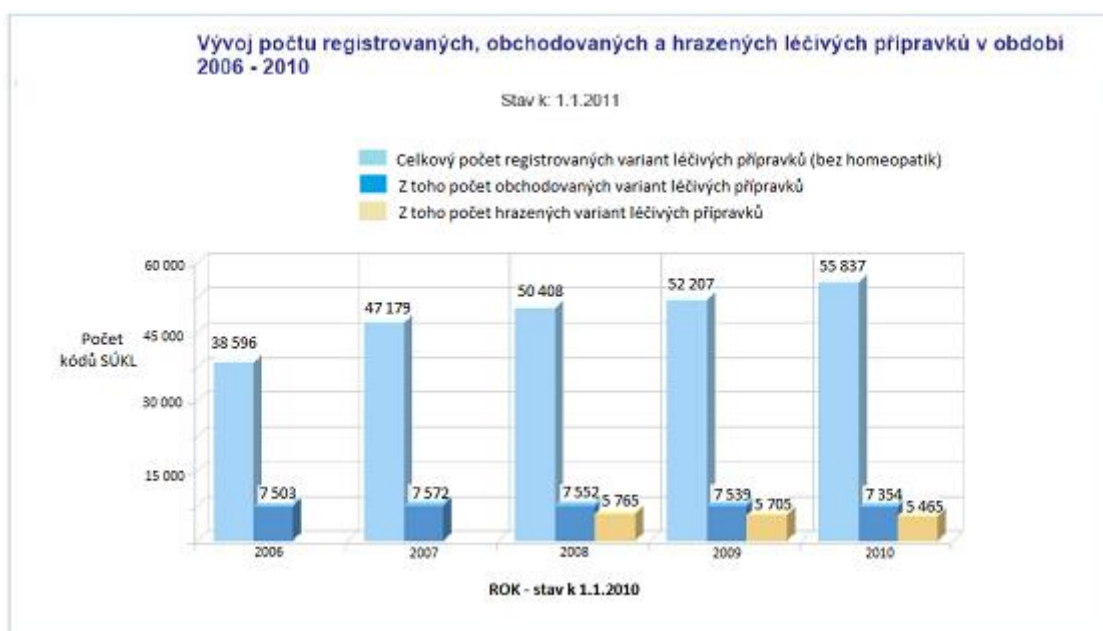
Řešení projektu představuje:

1. Zpracování literární rešerše a přehled poznatků o metodikách fytoimediačních experimentů/technik
2. Příprava sterilních rostlin kukuřice a slunečnice „in vitro”
3. Kultivace v mediu obohaceném o piroxikam, ketoprofen, nimesulid, paracetamol
4. Odběr vzorků ve 24 hodinových intervalech z medií kultivovaných rostlin za sterilních podmínek
5. Analýza medií a stanovení koncentrací studovaných látek pomocí HPLC
6. Stanovení fytoextrakční schopnosti použitých rostlinných druhů

3. FARMAKA V EKOSYSTÉMU

V poslední době značně vzrůstá spotřeba léčiv, a tudíž i množství jejich reziduí v přírodních ekosystémech. Je tedy nezbytné zabývat se i jejich případnými negativními vlivy na životní prostředí. Uvolněná léčiva či jejich metabolity mohou představovat ekotoxikologické riziko pro řadu organismů. V poslední době se stále častěji objevují důkazy, které vypovídají o tom, že řada těchto látek jsou perzistentní vůči životnímu prostředí.

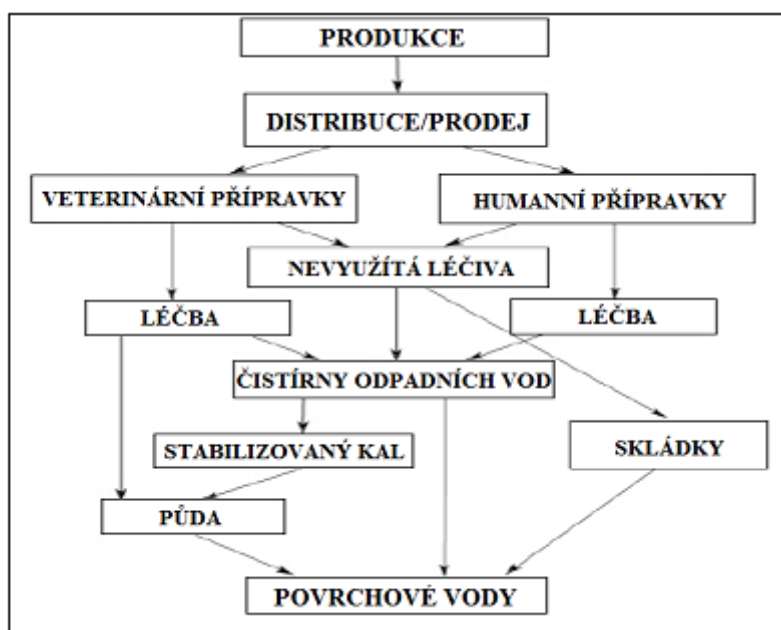
Používání léčiv prošlo během let různými stupni vývoje. K významnému rozvoji spotřeby došlo v období po 2. světové válce a od této doby neustále roste. (obr. 1.)



Obrázek 1: Vývoj léčivých přípravků v období 2006-2010, www.sukl.cz

Distribuce farmak v životním prostředí se poněkud liší v porovnání s tradičními polutanty. Značnou nevýhodou ve srovnání s průmyslovými odpady a agrochemikáliemi je jejich značná biologická aktivita. Tato vlastnost plyne z faktu, že jsou léky vyráběny za účelem, aby postihovaly specifické systémy, jako jsou enzymy či receptory.

Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti. Léčiva jsou z organismu vyloučena a odcházejí díky splaškům až do čistíren odpadních vod (ČOV). Vzhledem k jejich vlastnostem nelze některé z nich dostatečně eliminovat a tak přecházejí dále do recipientu (obr. 2.). Recipient je zde chápán jako vodní útvar, do něhož vyúsťují povrchové vody, a zde lze koloběh těchto látek uzavřít. Za další důležitý zdroj znečištění jsou považovány léčiva s proslou trvanlivostí, které se do otevřeného koloběhu dostávají formou průsaků například ze skládek [15].



Obrázek 2: Tok léčiv v životním prostředí, převzato z: www.chemicke-listy.cz

Povrchové vody jsou z pravidla nejexponovanější oblastí životního prostředí. Stěžejní skupinou, která je relativně nejvíce vystavena reziduům v odpadních vodách jsou především vodní organismy. Co se týče podzemních vod, doposud bylo uskutečněno jen málo měření zabývajících se znečištěním. Z dostupných zdrojů lze, ale konstatovat, že znečištění podzemních vod není tolik znatelné, vzhledem k dobré izolaci od povrchových vod, a díky vrstvám s nízkým koeficientem rozpustnosti a dobrou sorpční schopností zemín [15,16].

V České republice prozatím není k dispozici mnoho údajů o přítomnosti léčiv v životním prostředí. Léčiva s největším objemem distribuce jsou zahrnuta na obrázku 3. Lze proto jen velmi těžko odhadnout, do jakého stupně je naše okolí farmaky zasaženo [15].

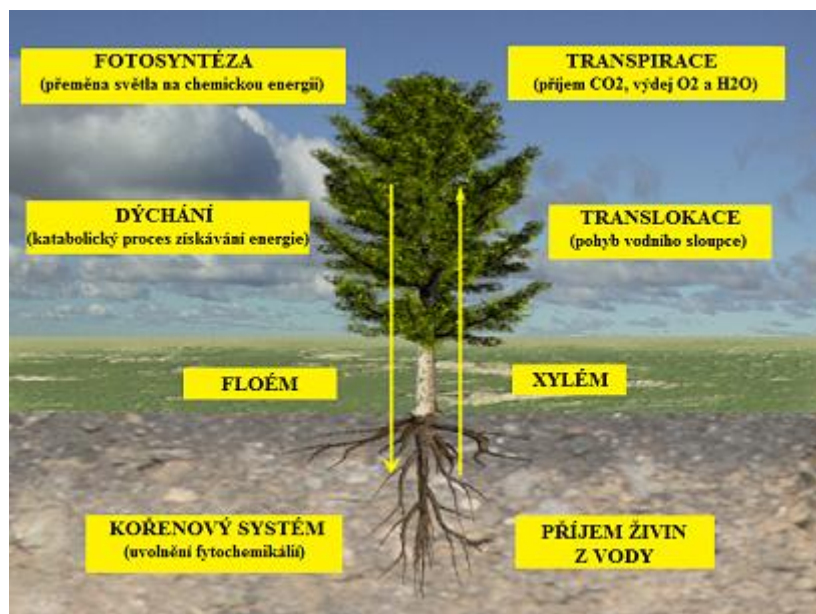
TOP 7 léčivých přípravků podle hlavních ATC skupin v počtech balení			
Rok	ATC	Název skupiny	Počet balení (mil.)
2010	N02BE01	Paracetamol	12,467
2010	M01AE01	Ibuprofen	9,503
2010	B05BB01	Elektrolyty	8,920
2010	N02BE51	Paracetamol, kombinace kromě psycholeptik	5,263
2010	C10AA05	Atorvastatin	3,872
2010	B01AC06	Kyselina acetylsalicylová	3,743
2010	C09AA05	Ramipril	3,705

Obrázek 3: Léčiva s největším objemem distribuce v počtu balení za rok 2010

(www.sukl.cz)

4. FYTOREMEDIACE

Existuje více možností, jak odstranit určitá xenobiotika z životního prostředí pomocí fytořemediací. Způsoby odstranění toxické látky se liší hlavně v tom, zda bude látka rozložena, nebo pouze transportována z jednoho místa na druhé. Možnosti použití rostliny pro fytořediační techniky rozhoduje její schopnost přijímat polutanty ze svého okolí. To jak bude transport probíhat, záleží jak na typu rostliny, tak i na druhu škodlivé látky. Příjem látek může probíhat několika způsoby - prostřednictvím půdní vody a případnou následnou translokací xylémem, difuzí do kořenů, depozicí částic z půdy nebo vzduchu na rostlinu nebo přímo absorpcí ze vzduchu (obr. 4).



Obrázek 4: Fyziologické procesy rostlin. <http://www.itrcweb.org> z roku 2009

4. 1 Rozdělení fytoremediačních technik

Fytoremediace lze rozdělit do 2 základních směrů – fytodekontaminace (fytoextrakce, rhizofiltrace, fytodegradace, fytovolatilizace) a fytostabilizace. Fytostabilizační techniky se využívají ve velmi znečištěných oblastech, kdy úkolem rostliny je stabilizace kontaminantů v pletivech či převedení kontaminantů do nerozpustné podoby [5,6].

Kontaminace ekosystému můžeme rozdělit na 2 základní typy, dle toho zda se jedná o látky organické nebo anorganické. Co se týče anorganických kontaminantů, bývají zdrojem znečištění například ionty těžkých kovů či radioaktivní látky. U organického typu znečištění, sem můžeme zahrnout širokou škálu látek jako – výbušniny, barviva, ropné produkty a další. V poslední době se pozornost soustřeďuje na léčiva, detergenty, retardanty koření nebo komponenty kosmetických přípravků. Tyto všechny látky mohou způsobovat nemalé poškození životního prostředí [5].

Vzhledem k horizontálnímu i vertikálnímu přenosu kontaminantů dochází k narušení společenství žijící na pevné zemi, ale také na druhy žijící ve vodě. Bylo zjištěno, že vodní výluhy kontaminovaných půd jsou genotoxické, z čehož vyplývá, že kontaminovaná zemina může ohrozit rovnováhu ve vodním prostředí. Důsledky

ohrožení samotného lidského organismu jsou ovlivňovány řadou faktorů, které určují výsledný efekt, jako je např. koncentrace a doba expozice [6].

4.1.1 *Fytoextrakce (fytoakumulace)*

Princip fytoextrakce je založen na absorpci kontaminantů do kořenů a následné případné akumulaci v nadzemní části rostliny. Některé druhy rostlin jsou vysoce tolerantní vůči přítomnosti toxických látek a dokáží akumulovat tyto látky do vysoké míry ve svých pletivech bez nepříznivého vlivu na metabolismus a tvorbu biomasy. Na konci celého tohoto procesu je polutant koncentrován v mnohem menším objemu, než tomu bylo v dekontaminovaném ekosystému.

Existují dvě strategie fytoakumulace, indukovaná (asistovaná) a přirozená. U přirozené fytoextrakce dochází ke kontinuální akumulaci polutantů v rostlině. Rostlina je sama schopná přijmout danou látku svými kořeny. Při indukované fytoextrakci je do půdy přidáváno aditivum, které zvýší celkovou rozpustnost nebo mobilitu kontaminantu, takže ho rostliny mohou přijímat snadněji. Pro zvýšení účinku fytoakumulace kovových iontů se do půdy či vody přidávají syntetické chelátory, např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA).

Důležitým atributem rostliny vhodné pro fytoextrakci je, aby rostlina měla rychlý přírůstek biomasy a dokázala akumulovat velké množství kontaminantu v nadzemních orgánech. Rostliny jsou vysázeny na potřebná stanoviště, kde jsou ponechány růstu několik týdnů či celé vegetační období. Posléze dochází k následné sklizni rostlin a k dalšímu zpracování, ať už tepelně, mikrobiálně nebo chemicky. Tento proces je opakován do té doby, dokud nedojde k dostatečnému snížení daného polutantu v příslušné lokalitě. Důležitým faktorem je způsob likvidace rostlin. Nejčastější cestou likvidace rostlin je jejich spálení (s takovýmto popelem je třeba zacházet jako s nebezpečným odpadem). Spalování musí probíhat za příslušných podmínek, aby se škodliviny nevracely zpět do životního prostředí [7,5].

4.1.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace je metoda, která využívá určité druhy rostlin k imobilizaci půdních a vodních kontaminantů. Mechanismus fytostabilizace závisí na absorpci a akumulaci kořeny daného polutantu. Tímto procesem se mobilita toxické látky redukuje a zabraňuje jejímu dalšímu šíření v dané lokalitě. Při fytostabilizaci se uplatňují často i huminové látky, které jsou velmi důležitou složkou půdy, jelikož na sebe mohou vázat některé kontaminanty.

Tuto techniku, lze použít tam, kde chybí přirozený vegetační pokryv z důvodu vysoké kontaminace, a tak nelze na zasažená území aplikovat přirozenou vegetaci. Tím se snižuje riziko znečištění okolí, zapříčiněné vodní či půdní erozí, transportem nebo vymýváním [8,9].

4.1.3 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je založena na transportu kontaminantů z vody a půdy do atmosféry. Je to schopnost některých rostlin přeměňovat škodlivé polutanty do těkavé formy a zachycovat těkavé organické sloučeniny z okolí. Nevýhodou této metody je, že nedochází k celkovému odstranění kontaminantu z prostředí, ale pouze jeho přesunu do ovzduší.

Tato metoda je výhodná při odstraňování organických polutantů, kam řadíme například MTBE či jiné složky benzínu. Dále může být metoda fytovolatilizace využita např. k zneškodnění kontaminace rtutí. Výhodou tohoto postupu odstraňování kontaminantů z okolí jsou velmi nízké náklady, protože kontaminant mohou odstraňovat stále stejné rostliny, a tudíž není nutná jejich sklizeň a následné zpracování odpadu [9].

4.1.4 Fytodegradace

Další metodou je fytodegradace, která se dá využít pouze pro odstranění organických látek (TPH, PAH, PCB, TCE, detergenty, pesticidy, výbušniny a jiné nitrolátky), jelikož látky anorganické touto metodou degradovatelné nejsou. Při fytodegradaci dochází k absorpci, přenosu a rozkladu kontaminantu uvnitř rostliny. Podmínkou aplikovatelnosti je případná transformace kontaminantu na látku, která není pro danou lokalitu, ale i příslušné organismy toxická [9]. Účinnost procesu záleží samozřejmě i na fyzikálních a chemických vlastnostech polutantu, na jeho koncentraci v půdě nebo vodě a na vlastnostech samotných rostlin.

Přeměněný kontaminant je v rostlině ukládán nebo uvolněn do prostředí. Podmínkou této metody je zajistit, aby nevznikaly produkty ještě toxičtější než samotné výchozí látky [11].

4.1.5 Rhizodegradace (fytostimulace)

Rhizodegradace je rostlinnými kořeny stimulovaná mikrobiální degradace organických sloučenin. Tato zóna tvořená spleť kořenů poskytuje prostor pro mikrobiální růst. V rhizosféře se vyskytuje přirozeně celá řada bakterií, aktinomycet a hub, které ovlivňují přísun živin ke kořenům a metabolizují vyskytující se organické kontaminanty. Rostlina pomocí kořenů vylučuje do půdy mnoho organických sloučenin (např. cukry nebo alkoholy), jež slouží jako potrava pro půdní bakterie. Při zvýšené koncentraci vylučovaných látek, které rostlina odvádí, dochází ke stimulaci aktivity mikroorganismů, což je velmi důležité pro odbourávání případných polutantů [9].

4.1.6 Rhizofiltrace

Při rhizofiltraci dochází k vysrážení kontaminantu na kořenové zóně nebo k absorpci přímo na kořenech z povrchových či podzemních vod. Rostliny, které jsou užívány na tuto metodu, se pěstují v nádržích s vodným substrátem, kde přívod kontaminované vody může být aplikován *in situ* nebo je voda přečerpána do speciálních nádob, ve kterých jsou dané rostliny vysázeny. Rostliny se v nádobách aklimatizují a vyvíjejí rozsáhlý kořenový systém, kterým jsou schopny odstraňovat kontaminanty. Když jsou kořeny rostlin nasyceny, dochází ke sklizni spalováním nebo kompostováním.

Pro rhizofiltraci jsou vhodné kořeny hydroponicky vypěstovaných suchozemských rostlin jako je např. slunečnice. Priorita těchto rostlin spočívá ve schopnosti rychlého růstu a produkce velkého množství kořenové biomasy [3,4].

4.2 Výhody a nevýhody fytořemediací

Fytořemediační techniky se pomalu stávají jednou z velmi efektivních metod pro odbourávání a transport xenobiotik v životním prostředí. Díky těmto metodám přibývá v půdě organického uhlíku (mineralizace), který stimuluje aktivitu mikroorganismů. Na druhé straně je nutné brát v úvahu, že tuto metodu nelze aplikovat ve všech situacích (míra kontaminace) a pro všechny typy kontaminantů.

Výhody:

Aplikace rostlin v kontaminovaných oblastech má řadu výhod. Mezi první pozitiva patří to, že tato metoda minimálně poškozuje okolí, jelikož dochází k využití přirozených systémů (rostlin) v jejich přirozeném prostředí a potřebná energie je získávána ze slunečního záření. Dalším přínosem fytořemediací je to, že dochází k částečné mineralizaci organických sloučenin, což má za důsledek zúrodnování půd. Rostliny lze využít k dekontaminaci znečištěných oblastí či jen k dočištění po použití

jiných postupů. Má také velkou výhodu v tom, že esteticky obohacuje případně zdevastovanou krajinu. Ekonomické náklady na uskutečnění jsou až několikanásobně nižší než u jiných technik (obr. 5) [10,11,17].

Použitá metoda	Náklady (\$/t)
Fytoremediace	10-35
In situ bioremediace	50-150
Venting	20-220
Termální desorpce	120-300
Vymývání půdy	80-200
Solidifikace, stabilizace	240-340
Extrakce rozpouštědly	360-440
Spalování	200-1500

Obrázek 5: Náklady remediačních postupů, <http://www.phytosanitary.org>

Nevýhody:

Za hlavní nevýhodu fytořemediací můžeme považovat relativně dlouhou dobu potřebnou k vyčištění kontaminované oblasti, která je znatelně pomalejší, nežli fyzikálně chemické postupy. Při odstraňování polutantů ze životního prostředí nedochází ke 100% odstranění škodlivých látek. Další nevýhodou fytořemediálních metod, je považováno to, že je nelze použít při vysokých koncentracích kontaminujících látek v prostředí, jelikož přežití rostlin je závislé na toxicitě kontaminantu. K neprospěchu metod přispívá i to, že následné uplatnění rostlin není možné vzhledem k existující bioakumulaci xenobiotik v samotných rostlinách. Dále mezi nevýhody metody můžeme zařadit omezené využití pouze do hloubky 20 cm, do níž zasahuje kořenový systém rostlin a možné negativní ovlivnění průběhu dekontaminace vlivem např. klimatických podmínek [10,11].

5. NESTEROIDNÍ ANALGETIKA

Nesteroidní analgetika jsou látky, které potlačují pocit bolesti, aniž by výrazně ovlivňovaly smyslové vnímání. Analgetika přímo neléčí příčinu onemocnění, jsou to takzvané symptomatické látky, kdy jejich podávání však může významně napomáhat vlastnímu léčení tím, že snižují zátěž a stres organismu způsobený bolestí a zánětem. Analgetika se dělí podle míry a mechanismu účinku na analgetika narkotická, nazývaná též anodyna či opioidní analgetika, a na analgetika-antipyretika. Tato skupina se označuje jako nesteroidní protizánětlivé látky (Non-Steroidal Anti -Inflammatory Drugs - NSAID) [1].

Nesteroidní analgetika také známá pod názvem antiflogistika (NSAF) zahrnují mnoho různých látek z nejrůznějších chemických skupin. Základním mechanismem těchto látek je inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX). Tento enzym katalyzuje konverzi arachidonové kyseliny na prostanoidy, které v zanícené tkáni evokují manifestaci zánětu [13,18].

COX se vyskytuje ve dvou isoformách jako COX-1 a COX-2. COX-1 je přítomna i ve zdravém těle a tvoří prostaglandiny, které chrání vnitřní orgány jako např. žaludek a ledviny. COX-2 vzniká v buňkách jen při zánětu a produkuje prostaglandiny, které zvyšují citlivost nervových zakončení a zesilují bolest spojenou se zánětem [14]. Afinita všech NSAF dává možnost rozdělit jednotlivé látky této skupiny podle afinity k těmto isoenzymům a tedy podle frekvence nežádoucích účinků. Podle tohoto třídění existují 4 skupiny. První skupina je COX-1 selektivní (aspirin), druhou skupinu tvoří látky COX-1 neselektivní, tuto skupinu lze dále rozdělit na COX-1 neselektivní s vyšší afinitou ke COX-1 (indometacin, piroxicam), braná jako velmi toxická NSAID a COX-1 neselektivní s vyšší afinitou na COX-2 (ibuprofen, diklofenak, naproxen). Třetí skupina zahrnuje látky COX-2 preferenční (meloxicam, nimesulid) a konečně čtvrtou skupinu tvoří látky COX-2 specifické, kam řadíme tzv. koxiby [13,18].

Veškerá nesteroidní analgetika vykazují kromě analgetického rovněž antipyretický a antiflogistický účinek. Většina těchto léčiv má podobný mechanismus působení, u některých ale vystupují více do popředí antipyretické (analgetika-antipyretika) a u jiných naopak účinky protizánětlivé (nesteroidní protizánětlivé látky NSPZL). Analgetika-antipyretika jsou látky, které snižují

vnímání bolesti (nepůsobí však proti viscerální a silné bolesti) a zároveň snižují zvýšenou tělesnou teplotu [1].

Po chemické stránce představují NSAID velmi nejednotnou skupinu farmak, která však má řadu společných farmakodynamických vlastností, a proto i stejné indikace. Z hlediska chemické struktury lze nenarkotická analgetika rozdělit na deriváty anilinu, deriváty salicylové kyseliny, deriváty anthranilové kyseliny, deriváty 2-arylalkanových kyselin, různé typy oxoheterocyklických sloučenin, což jsou deriváty pyrazolonu a pyrazolidindionu, či nejnovější oxikamy a další [1,2].

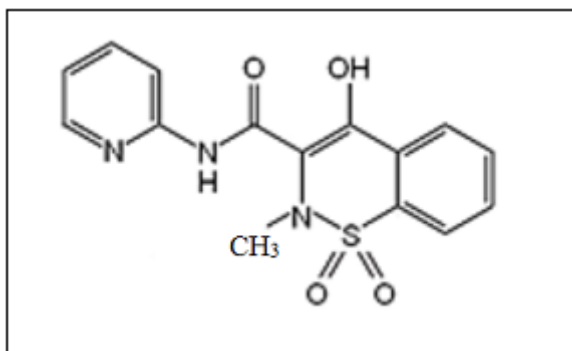
5. 1 Piroxikam

Piroxikam patří mezi hlavní zástupce enolových kyselin, označovaný jako oxikamy společně s dalšími jako je meloxikam a tenoxikam. Oxikamy jsou poměrně novou skupinou nesteroidních protizánětlivých látek, zavedenou do klinické praxe koncem 70. let minulého století. Tato látka patří do skupiny NSAID, které mají vyšší afinitu ke COX-1 [2].

Piroxikam má analgeticko-antipyretické a protizánětlivé účinky. Kromě inhibice cyklooxygenasy, inhibuje aktivaci neutrofilů, čímž se zesiluje jejich protizánětlivý účinek. Další jejich výhodou je vysoká vazba na plazmatické bílkoviny a dlouhý poločas eliminace, který umožňuje podávání látky jen jednou denně. Mimoto piroxikam inhibuje ADP-indukovanou agregaci trombocytů [1,2,19].

Piroxikam se po podání per os resorbuje částečně již v žaludku a dále úplně v duodenu (dvanáctník). Koncentrace v plazmě dosahuje maxima za 2-3 hodiny, zatímco po rektálním podání dosahuje koncentrace maximálních hodnot za 5-6 hodin. Za 6-10 hodin po aplikaci dochází v plazmě k novému vzestupu hladiny piroxikamu, tento děj je podmíněn pravděpodobně jeho enterohepatálním oběhem. Piroxikam se metabolizuje v játrech (hydroxylace pyridinového řetězce, konjugace s kyselinou glukuronovou). Vzniklé metabolity jsou neúčinné a dochází k jejich vyloučení močí. Pouze 2-5% je vyloučeno ledvinami v nezměněné formě [19].

Krátkodobé i dlouhodobé užívání je spojeno se zvýšeným rizikem nežádoucích účinků v gastrointestinálním traktu, jako je např. krvácení, ulcerace a perforace žaludku, tenkého nebo tlustého střeva a výskytu poruch ledvinových funkcí. Poregistrační studie prokázaly, že riziko vážných gastrointestinálních nežádoucích účinků piroxikamu, je ve srovnání s ostatními nesteroidními antirevmatiky vysoké [19,20].



Obrázek 6: Piroxikam

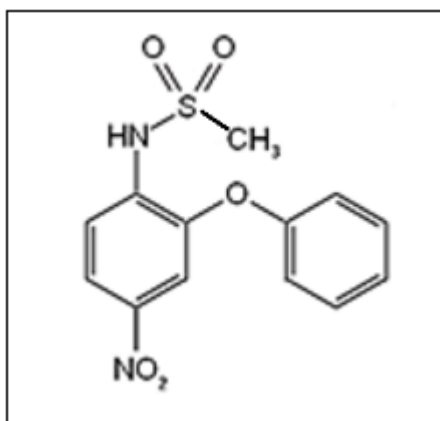
5. 2 Nimesulid

Nimesulid patří do novodobých tříd nesteroidních léků (NSAID) s analgetickými a antipyretickými účinky. Tato látka byla poprvé uvedena na trh v roce 1985 v Itálii. Od této doby byla produkce zahájena v dalších 50 zemích světa, avšak např. v USA, Japonsku či Austrálii tento lék nebyl nikdy povolen, kvůli svým nežádoucím účinkům na játra [1,2].

Toto analgetikum patří do skupiny inhibitorů enzymu cyklooxygenasy, tzv. COX-2 selektivní. Jeho hlavním účinkem je snížení nadprodukce eikosanoidů v místě zánětu, tato látka také blokuje tvorbu volných kyslíkových radikálů a zároveň působí jako jejich lapač. Dalším významným účinkem je snížení uvolňování enzymů z neutrofilů, které ničí pojivovou tkáň a chrupavku. Strukturálně je řazen mezi sulfoanilidy [2].

Po perorálním podání se tato látka relativně dobře vstřebává a k maximální koncentraci v plazmě dochází po 2-3 hodinách. Nimesulid je z velké části metabolizován v játrech. Hlavním jeho metabolitem je para-hydroxy derivát, který je také farmakologicky účinný. Metabolity nimesulidu se vylučují převážně močí, pouze 1-3% se vylučuje jako nezměněná sloučenina [19].

Co se týče nežádoucích účinků, nejčastěji se vyskytují v oblasti gastrointestinálního traktu. Občasné dochází k výskytu peptických vředů, perforaci či krvácení do orgánů trávicího ústrojí. Po podání se může objevit nevolnost, zvracení a další nežádoucí účinky. Díky všem těmto toxickým účinkům je nimesulid předepisován pouze jako lék druhé volby [19,1].



Obrázek 7: Nimesulid

5. 3 Ketoprofen

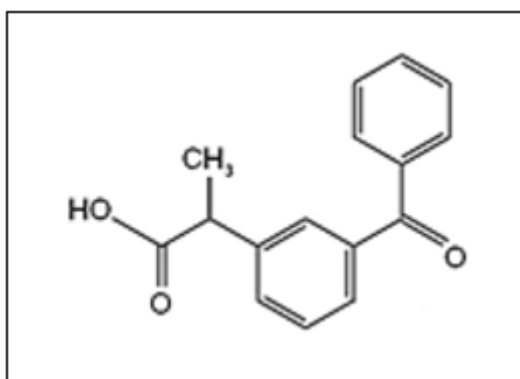
Ketoprofen (keprofen) je nesteroidní protizánětlivý lék (NSAID) se silným antiflogistickým, analgetickým a antipyretickým účinkem. Tuto látku řadíme mezi skupinu derivátů propionové kyseliny. Ketoprofen má blízké účinky ibuprofenu [1,2].

Ketoprofen se používá k symptomatické léčbě zánětlivých, metabolických a revmatických onemocnění. Je určen ke zmírnění některých akutních i chronických bolestivých syndromů. Mechanismem protizánětlivého účinku ketoprofenu je stabilizace lysozomální membrány. Další funkcí je inhibice syntézy prostaglandinů a leukotrienů, které se podílejí na vzniku bolesti a zánětu. Kromě inhibice enzymů cyklooxygenasy inhibuje i v menší míře lipooxygenasy [1,2,19].

Ketoprofen se dobře a relativně rychle vstřebává z gastrointestinálního traktu. Po perorálním podání dosahuje maximální koncentrace v plazmě za 1-2 hodiny. Tato látka se primárně metabolizuje extenzivně v játrech pomocí mikrozomálních enzymů. Dále je vylučována z těla ven ve vazbě s kyselinou glukuronovou. Močí se vylučuje 90% ketoprofenu s navázanou kyselinou jako glukuronidový metabolit.

Asi 10% se vyloučí stolicí. Vzhledem k intenzivnímu metabolismu ketoprofenu je biologický poločas cca 2 hodiny [19].

Nejčastěji pozorované nežádoucí účinky jsou v okolí gastrointestinálního traktu. Mohou se objevit peptické vředy, dyspepsie, nauzea či bolesti břicha. Klinické studie poukazují hlavně na to, že podávání některých nesteroidních antirevmatik, a to zejména ve vysokých dávkách a při dlouhodobé léčbě, může souviset se zvýšeným rizikem arteriálních trombotických příhod, jako jsou např. infarkt myokardu či mrtvice [19,20].



Obrázek 8: Ketoprofen

5. 4 Paracetamol

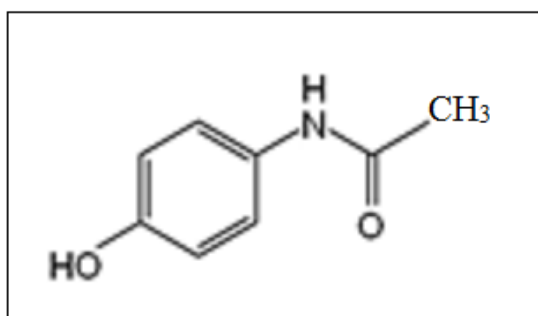
Paracetamol je nesteroidní lék s analgetickými a antipyretickými účinky. Řadíme ho mezi anilinové deriváty společně s fenacetinem. Paracetamol je aktivním metabolitem fenacetinu, acetanilidu a benorilátu. Po kyselině acetylsalicylové je nejužívanějším analgetikem-antipyretikem. Poprvé byl tento lék vyvinut v roce 1893 v laboratořích firmy Bayer. Zájem o paracetamol byl založen na příbuznosti s látkou zvanou fenacetin, která se několik desetiletí používala jako analgetikum. Po dalším pozorování vyšlo najevo, že sloučenina fenacetin je při dlouhodobém použití toxická pro játra a ledviny. Výsledkem této práce bylo zavedení paracetamolu do léčebné praxe [1,2,20].

Paracetamol má menší vliv na COX v těle než aspirin, a proto netlumí zánět ani nezastavuje aktivaci nervových zakončení citlivých na bolest stejně silně jako aspirin. Inhibuje však COX v mozku a v tom spočívají jeho analgetické

a antipyretické účinky. Paracetamol je mnohem bezpečnější než aspirin, jelikož se nehromadí v žaludeční sliznici a neinhibuje COX v žaludku [18].

Distribuce paracetamolu po perorálním podání je rychlá a kompletní. Dochází k rychlému a téměř úplnému vstřebávání z gastrointestinálního traktu. Maximální plazmatické koncentrace jsou dosaženy za 30-60 minut po požití. Paracetamol se metabolizuje dvěma hlavními cestami a to převážně v játrech. První cestou je vytvoření konjugátů s kyselinou glukuronovou a kyselinou sírovou. Druhá z těchto cest je při vyšších dávkách, kdy dochází k oxidaci paracetamolu vlivem cytochromu P450 na toxický, vysoce reaktivní intermediát N-acetyl-p-benzochinonimin, který za normálních podmínek reaguje s glutathionem za tvorby netoxické sloučeniny a následně je vyloučen močí. 90% užívané látky je eliminováno ledvinami během jednoho dne, hlavně ve formě glukuronátu a sulfátových konjugátů [19].

Nežádoucí účinky paracetamolu jsou vcelku vzácné. Nebezpečné je časté používání vysokých dávek. Příčinou rizikovosti nadměrných dávek paracetamolu je skutečnost, že po něm játra spotřebují jednu ze svých ochranných sloučenin glutathion, který reaguje s již zmiňovaným N-acetyl-p-benzochinoniminem. Akutní intoxikace paracetamolem způsobuje nekrózu jaterní tkáně, která může vést až k vzniku fatálního poškození jater. Aby se zabránilo nežádoucímu účinku paracetamolu, podává se v některých zemích současně s paracetamolem methionin, který zvyšuje přísun glutathionu do jater a snižuje tvorbu toxických sloučenin poškozujících ledviny [19,20].



Obrázek 9: Paracetamol

6. METABOLISMUS ORGANICKÝCH LÁTEK V ROSTLINNÝCH BUŇKÁCH

6. 1 Metabolické aspekty fytořemediace

Fytořemediační techniky jsou stále ve vývojovém stádiu. Nejrychleji a také nejúspěšněji se tyto metody vyvíjí v oblasti dekontaminace organických látek. Aby mohly být organické látky metabolizovány, musí být biologicky přístupné pro adsorpci, absorpci, transport a transformaci buď rostlinami nebo systémem mikroorganismů v rhizosféře [11,17].

Rostlinná buňka disponuje širokou škálou enzymů, které jsou schopné v menší či větší míře metabolizovat xenobiotika ze životního prostředí. Tento složitý proces odbourávání cizorodých látek je založen na podobnosti složitých struktur v rostlině a samotným polutantem [12].

Za biotransformaci škodlivých látek jsou označovány procesy, které vedou k jejich snadnému vyloučení nebo potlačení jejich negativního působení v samotných organismech. Rostliny přijímají a přeměňují organické látky pomocí několika mechanismů. Prvním mechanismem je přímá absorpce kořeny a přesun do rostlinné tkáně a následnou akumulací ve formě nefytotoxických metabolitů. Druhou cestou je uvolňování enzymů, které podporují mikrobiální aktivitu a biochemickou transformaci v půdě. Dále může docházet ke zvýšené mineralizaci v samotném kořenovém systému a čtvrtý způsob je absorpce povrchem listů z atmosféry [11].

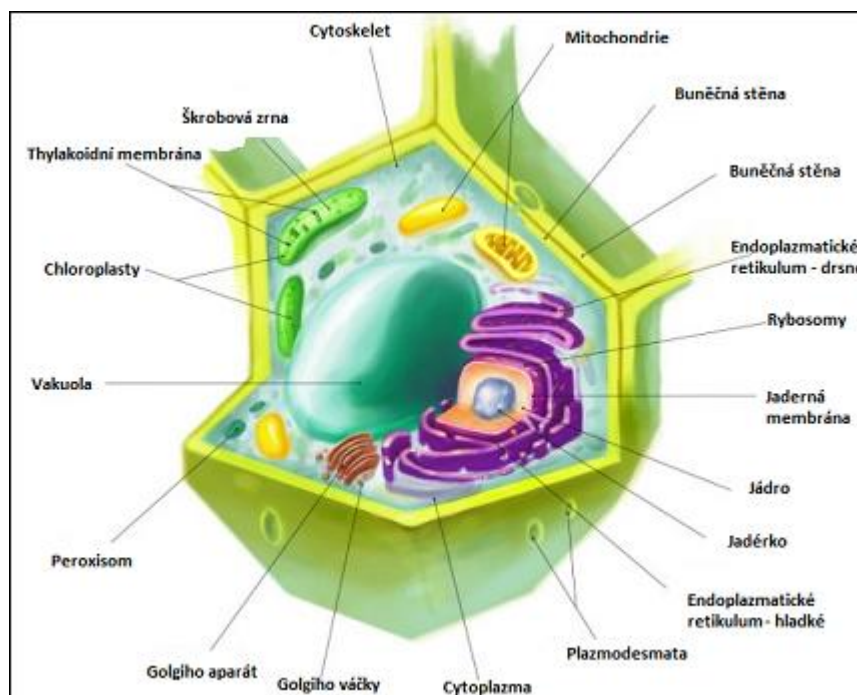
6. 2 Fytotransformace

Metabolismus xenobiotik v rostlinách můžeme také rozčlenit do 3 fází (obdobně jako u člověka). U živočichů dochází k přeměně škodlivin v játrech, kde jsou nepolární (lipofilní) látky metabolizovány na rozpustnější a jednodušší formy a následně vylučovány. U rostlin je tomu tak obdobně, přestože nemají skutečnou efektivní cestu vylučování [17].

První fáze (transformační/derivační) zahrnuje enzymově katalyzované odhalení polárních skupin molekuly xenobiotika nebo tvorbu detoxikačních metabolitů. V řadě případů však dochází k metabolické aktivaci nemutagenních látek

na mutagenní produkty. Následná druhá fáze je označována jako primární konjugace. Polárnější metabolity jsou pospojovány kovalentními vazbami s molekulami endogenních hydrofilních sloučenin (glutathion, aminokyseliny). Touto fází se toxicita daných xenobiotik značně snižuje a konjugáty jsou ukládány v rostlinných systémech – vakuolách (obr. 8). Třetí fázi nazývanou ukládání nemusí podléhat úplně všechny metabolity a nahrazuje samotné vylučování. V této části metabolismu dochází k reakcím s určitými složkami buněčné stěny (ligniny, pektiny, hemicelulosami) [12].

Bylo dokázáno, že obdobně jako u živočichů se i v rostlinných buňkách vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč, který rostlina využívá pro transport přes membrány vakuol [12]. Nejdůležitějšími enzymy, které se účastní metabolismu cizorodých látek, jsou cytochrom P-450 monooxygenasy a glutathiontransferasy, ale i řada dalších. Tyto enzymy jsou v rostlinách hojně zastoupeny a mezi jejich hlavní funkce patří právě detoxikace [11].



Obrázek 10: Eukaryotická rostlinná buňka (schématicky),
(www.coroflot.com)

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použitý materiál

7.1.1 Chemikálie

Anorganické chemikálie pro přípravu kultivačního media byly v kvalitě vhodné pro analýzu (Lach-Ner), myo-inositol byl v kvalitě pro tkáňové kultury (Sigma), sacharosa byla použita ve formě komerčního krystalového cukru. Použitá nesteroidní analgetika piroxikam, nimesulid, ketoprofen a paracetamol byla pořízena od firmy Sigma. Methanol byl kvality pro HPLC (Lach-Ner). Voda pro přípravu medií i jako komponent mobilní fáze byla připravena na přístroji Demiwa 3roi.

7.1.2 Rostlinný materiál

Jako biologický materiál byla použita semena následujících druhů rostlin:

- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*), hybrid: Extrasol, Monsato
- Kukuřice setá (*Zea mays*), hybrid: Belem DKC2971, Monsato

7.1.3 Přístroje

Pro sterilní práci byl použit laminární box BHSL Labox, kultivace byly prováděny v kultivačních boxech TCH 100 9 (Laboratorní přístroje, Praha) při teplotě 25°C a světelném režimu 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Pro úpravu pH media byl použit pH metr IQ (Scientific Instruments).

HPLC analýzy byly provedeny na chromatografickém zařízení INCOS. Přístroj se skládal z vysokotlakového čerpadla INCOS LCP 5020, který zajišťuje tok mobilní fáze, dále z autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS LCS 5000. Pro samotné měření byla použita kolona o rozměrech 4,6 x 250 mm se sorbentem Reprosil 100-C18 5µm (Watrex). Nástřik vzorku byl standardně

prováděn automatickým dávkovačem o objemu 20 µl. Na zpracování a vyhodnocení naměřených dat koncentrace byl použit chromatografický program Clarity (Data Apex). Koncentrace byly stanoveny dle kalibrační závislosti, mez detekce činila pro piroxikam, nimesulid a ketoprofen 0,06 mg/l, pro paracetamol 0,04 mg/l.

Tabulka 1: Výchozí podmínky měření pro jednotlivá analgetika

Látka	Mobilní fáze (MeOH:H₂O+0,1%H₃PO₄) (v/v)	Průtok [ml/min]	Detekce UV [nm]
Piroxikam	6:5	1,0	235
Nimesulid	7:3	0,9	260
Ketoprofen	7:3	0,9	260
Paracetamol	3:6	0,8	240

7.2 Příprava *in vitro* kultur

Semena kukuřice seté a slunečnice roční byla před vysázením na kapalně živné medium odmaštěna v 70% etanolu po dobu cca 30 sekund a poté sterilizována 20% roztokem SAVA po dobu 10 minut. Následovala další sterilizace 10% roztokem SAVA po dobu 15 minut. Poté byla semena třikrát promyta destilovanou vodou, při třetím promývání byla semena ponechána ve sterilní vodě. Takto připravená semena byla za sterilních podmínek v laminárním boxu vysázena do sterilních kultivačních baněk s živným médiem. MS medium dle Murashiga a Skooga s přídavkem myo-inositolu a sacharosy [21]. Pro kultivaci byly použity 500ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml živého media.

Kultivace rostlin probíhala v kultivačních boxech při teplotě 25°C a se světelným režimem 12 hodin světlo/12 hodin tma. Po zhruba dvou týdnech dosáhly rostliny optimální velikosti pro další část experimentu.

7.3 Fytoextrakce piroxikamu, nimesulidu, ketoprofenu a paracetamolu

Vypočtené množství studovaných látek bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce v dimethylsulfoxidu (piroxikam, ketoprofen), v etanolu (nimesulid) a ve sterilizované vodě (paracetamol). Medium se zkoumaným analgetikem bylo připraveno přidáním vypočteného množství připraveného roztoku daného analgetika ke sterilnímu mediu, tak aby bylo dosaženo vstupní koncentrace 20 mg.

Za sterilních podmínek byly z kultivačních baňek s rostlinami odlity zbytky původního media a následně přidáno 100 ml čerstvého media obsahujícího definovanou koncentraci zkoumaného nesteroidního analgetika. Bezprostředně po přidání media byl odebrán kontrolní vzorek (0,3 ml) k stanovení aktuální výchozí koncentrace testované látky ve všech baňkách. Rostliny byly nadále kultivovány za výše zmíněných podmínek (25°C, 12h světlo/12h tma). Vzorky media byly poté odebírány v intervalu 24 hodin po dobu 5 dnů a dále přímo analyzovány HPLC, kde byla určena aktuální koncentrace příslušného nesteroidního analgetika v příslušném čase. Samotné rostliny byly po uplynutí kultivace zváženy, čímž byla získána hodnota čerstvé hmotnosti.

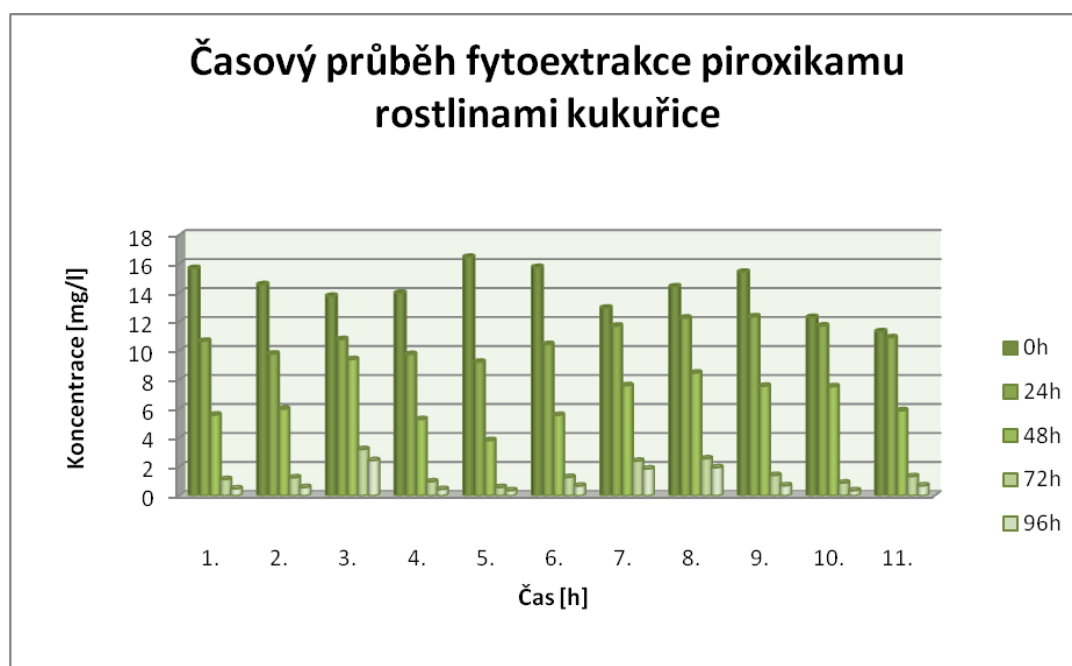
8. VÝSLEDKY A DISKUZE

V posledních letech je přítomnost organických sloučenin ze skupiny farmaceutických substancí považována za pseudo-perzistentní kontaminaci s možnými negativními účinky na lidský organismus. V modelových *in vitro* experimentech byla sledována fytoextrakce nesteroidních analgetik (piroxikam, nimesulid, ketoprofen, paracetamol). Fytoextrakce byla provedena na dvou hlavních rostlinných druzích.

Aktuální koncentrace nesteroidních analgetik byly stanovovány metodou HPLC přímým nástřikem media. Měření byla ukončena v okamžiku, kdy hodnoty koncentrací byly velmi nízké, nebo nebyla nalezena měřitelná koncentrace daného analgetika.

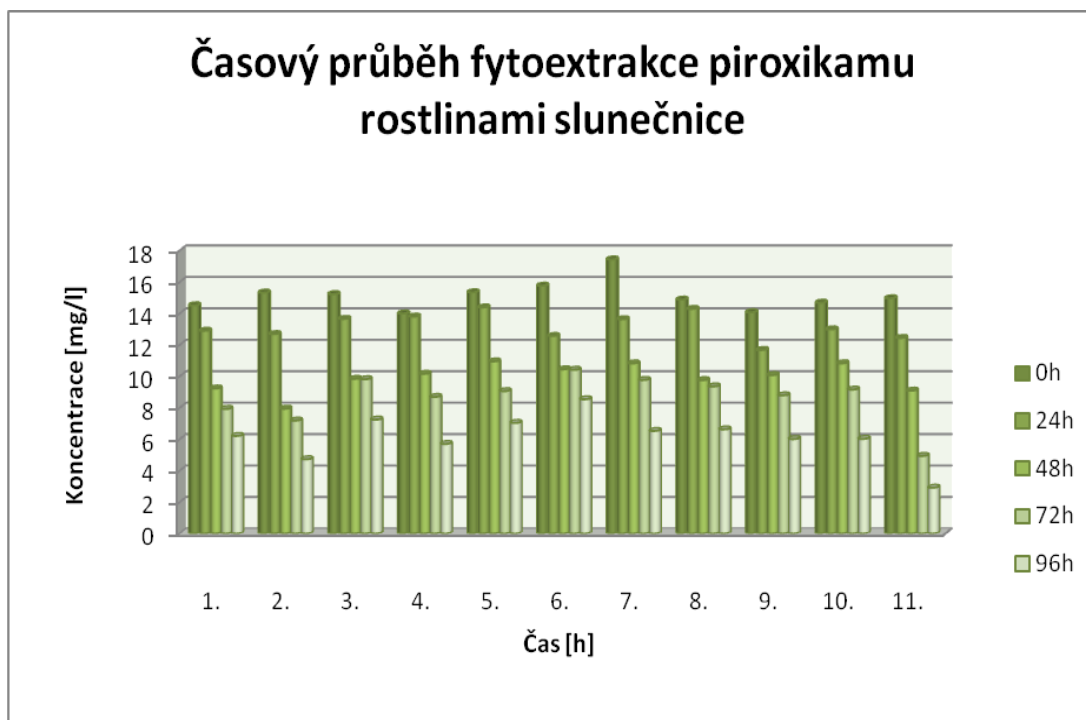
- **VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ MĚŘENÍ:**

V následujících grafech 1 a 2 jsou zpracovány údaje koncentrací. Data jsou zpracovaná pro nesteroidní analgetikum piroxikam pro porovnání fytoextrakce kukuřice seté a slunečnice roční.



Graf 1: Časový průběh fytoextrakce piroxikamu rostlinami kukuřice
(Kukuřice setá hybrid: DKC2971)

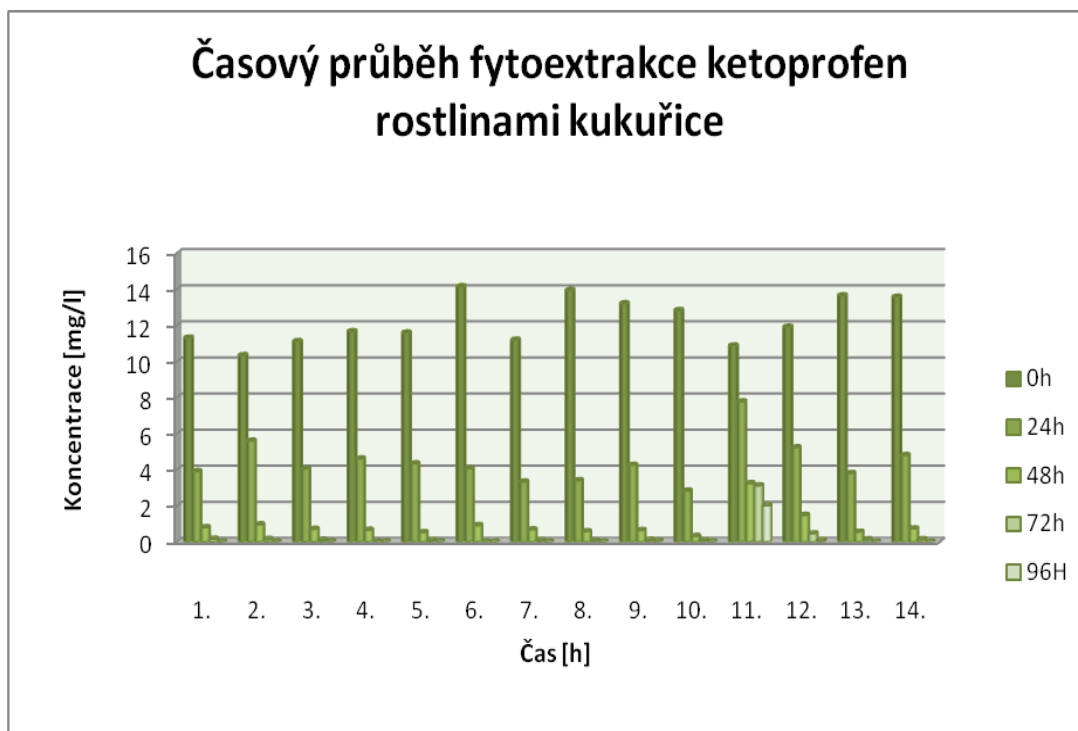
V případě rostlin kukuřice došlo během prvních 24 hodin k znatelnému úbytku koncentrace piroxikamu v mediu. Průměrný pokles činil cca 22% výchozí koncentrace. Po 48 hodinách došlo k poklesu množství piroxikamu o 39%. Během 72 hodin došlo k největšímu úbytku koncentrace průměrně o 77%. Z grafu 1 vyplývá, že piroxikam je rostlinami téměř extrahován.



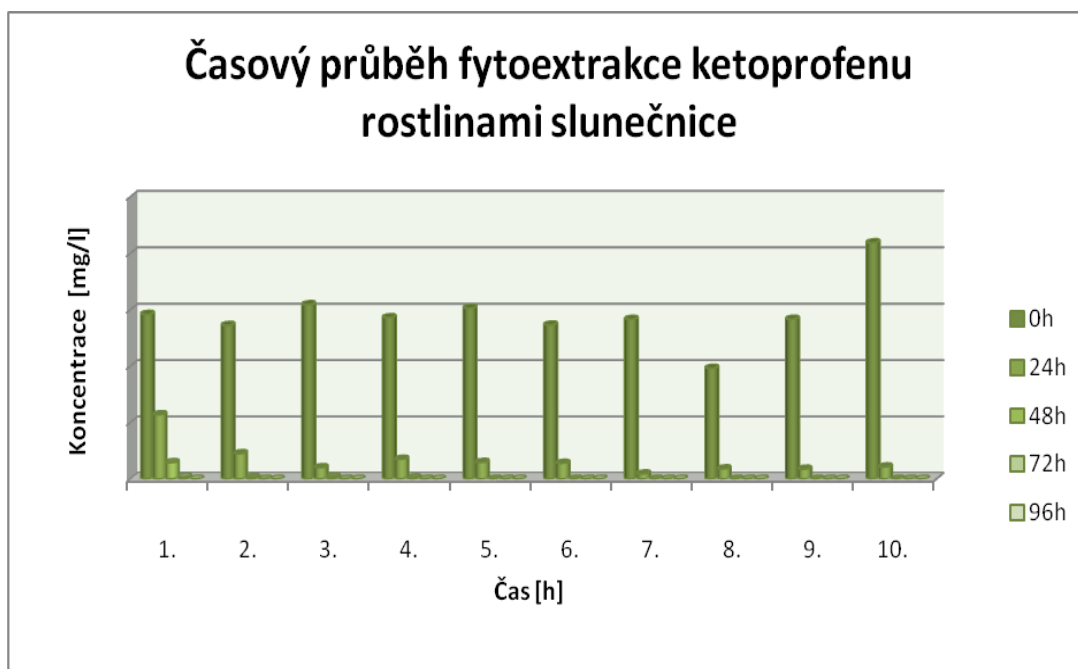
Graf 2: Časový průběh fytoextrakce piroxikamu rostlinami slunečnice
(Slunečnice roční hybrid: BELEM)

V případě experimentu rostlin slunečnice dochází k menšímu poklesu koncentrace piroxikamu v mediu, než tomu bylo u kukuřice, což může být dáno menší schopností rostlinné species extrahovat studovanou látku. Ve srovnání s rostlinami slunečnice je extrakce kukuřice zjevně účinnější. Avšak z uvedených výsledků je zřejmá poměrně účinná fytoextrakce piroxikamu, kdy k největšímu úbytku (29%) došlo v posledních 96 hodinách.

Následující grafy 3 a 4 popisují časový průběh fytoextrakce ketoprofenu rostlinami slunečnice roční a kukuřice seté.



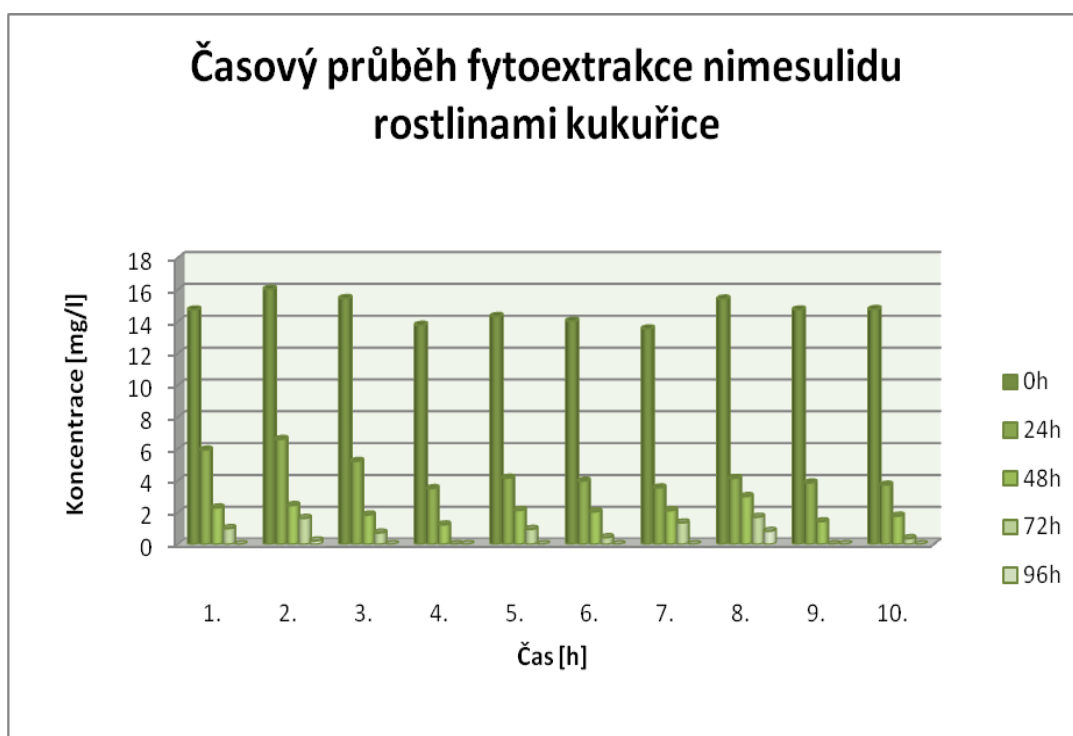
Graf 3: Časový průběh fytoextrakce ketoprofenu rostlinami kukuřice
(Kukuřice setá hybrid: DKC2971)



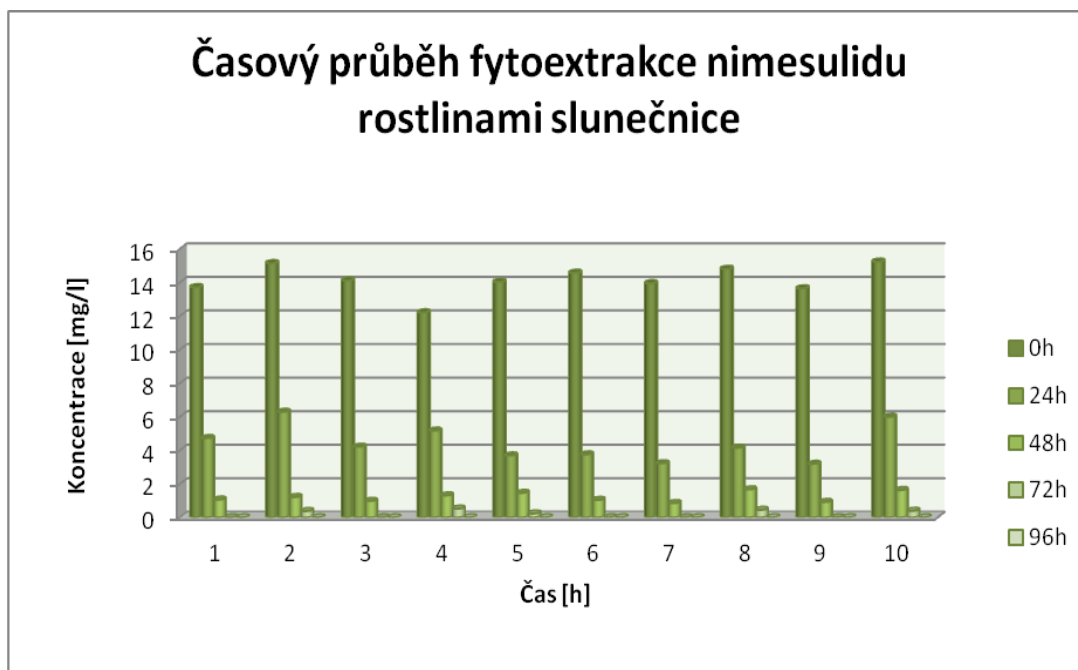
Graf 4: Časový průběh fytoextrakce ketoprofenu rostlinami slunečnice
(Slunečnice roční hybrid: BELEM)

Z grafů 3 a 4 je zřejmé, že k největšímu úbytku koncentrace ketoprofenu v mediu došlo během prvních 24 hodin o průměrnou hodnotu 62,5% u kukuřice a 87,7% u slunečnice výchozích hodnot. Po 96 hodinách již byl ketoprofen nalezen jen u kukuřice a to pouze u třech kultivací ze čtrnácti vyhodnocených. Reálně je tedy extrakce zřejmě ještě účinnější, protože jedna měřená hodnota silně vybočuje z hodnot naměřených u ostatních kultivací. Jak je zřejmé z výsledků měření, je ketoprofen rostlinami prakticky úplně extrahován.

V následujícím grafu 5 je znázorněn časový průběh fytoextrakce nimesulidu pomocí kukuřice seté. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV.



Graf 5: Časový průběh fytoextrakce nimesulidu rostlinami kukuřice
(Kukuřice setá hybrid: DKC2971)

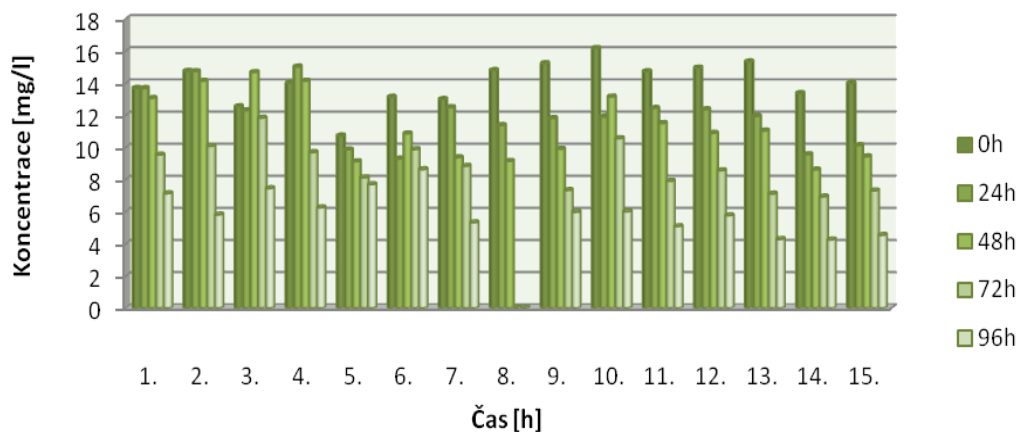


Graf 6: Časový průběh fytoextrakce nimesulidu rostlinami slunečnice
(Slunečnice roční hybrid: BELEM)

Z grafu 5 a 6 je zřejmá vysoká fytoextrakce nimesulidu z vodného media. K největšímu úbytku této látky došlo v prvních 24 hodinách. Po 96 hodinách byla prakticky ve všech případech koncentrace nimesulidu pod limitem detekce.

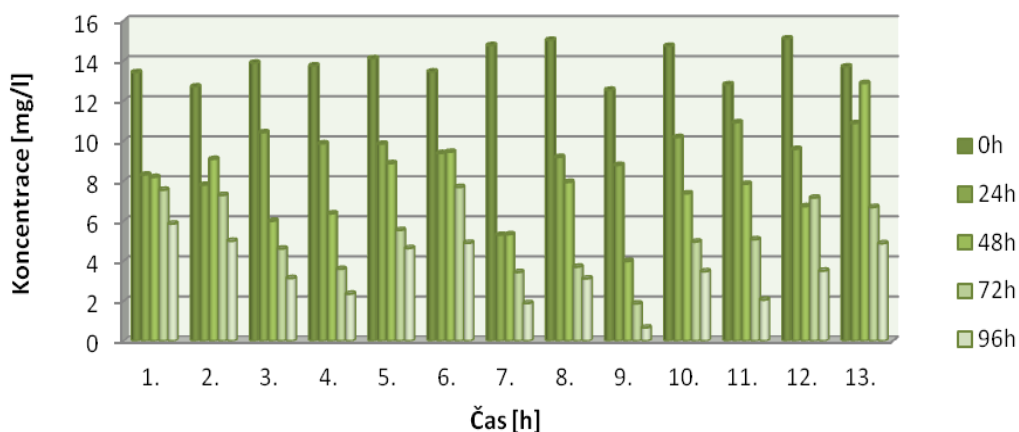
V následujících grafech 7 a 8 je znázorněný časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami slunečnice a kukuřice. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV.

Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami slunečnice



Graf 7: Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami slunečnice
(Slunečnice roční hybrid: BELEM)

Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami kukuřice



Graf 8: Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami slunečnice
(Kukuřice setá hybrid: DKC2971)

Z uvedených dat je zřejmá účinnost fytoextrakce paracetamolu z vodného media. Hodnoty naměřených koncentrací po 96 hodinách byly sice nejvyšší ze všech studovaných látek, ale i přesto je z výsledků zřetelná poměrně účinná extrakce paracetamolu.

Z hlediska zachytu studovaných látek rostlinami byly zjištěny hodnoty extrakční schopnosti při použitých výchozích koncentracích a kultivační periodě 96 hodin v rozmezí 82 – 105 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmotnosti rostliny. Konkrétně pro rostliny kukuřice 105, 72, 90 a 77 $\mu\text{g/g}$ u piroxikamu, nimesulidu, ketoprofenu a paracetamolu. U slunečnice byly vypočteny hodnoty 82, 127, 90 a 81 $\mu\text{g/g}$ pro piroxikam, nimesulid, ketoprofen a paracetamol.

Rostliny kukuřice a slunečnice mají poněkud odlišný metabolismus a odlišnou morfologii kořenů. Lze tedy předpokládat určité odchylky v extrakční schopnosti zkoumaných druhů. Nejvýrazněji se to projevilo u piroxikamu a nimesulidu, kdy byl nalezen signifikantně vyšší obsah piroxikamu v kukuřici a nimesulidu v rostlinách slunečnice. U ketoprofenu a paracetamolu jsou obsahy studovaných látek v rostlinách přibližně stejné. Z hlediska účinnosti zachytu se potom jeví jako nejvhodnější zachyt nimesulidu v kukuřici a ketoprofenu v obou zkoumaných rostlinných druzích.

9. ZÁVĚR

Studium vlivu organických polutantů na organismy je stále velmi aktuálním předmětem výzkumu mnoha vědeckých skupin po celém světě. Hlavním cílem této bakalářské práce bylo sledovat distribuci nesteroidních analgetik (piroxikamu, ketoprofenu, nimesulidu a paracetamolu) a posoudit, zda je možné použít kukuřici setou a slunečnici roční k fytoremediaci oblastí jimi kontaminovaných.

U obou rostlinných druhů byla prokázána schopnost extrahovat nesteroidní analgetika z vodných roztoků a jejich nevratný zachyt v rostlinných pletivech. Byly nalezeny rozdíly v zachytu jednotlivých farmak, přičemž k nejúčinnějším patřila extrakce nimesulidu v rostlinách slunečnice a ketoprofenu v obou použitých rostlinných druzích. Z hlediska množství látky zachycené rostlinou byly potom nalezeny vysoké hodnoty především při extrakci nimesulidu slunečnicí a ketoprofenu u obou použitých rostlinných species. Rozdíly mezi fytoextrakční schopností a kvantitativním vyhodnocením množství zachycené látky souvisí s odlišným metabolismem použitých rostlinných druhů, rozdílnou morfologií kořenů a možností stresového ovlivnění růstu rostliny, či mohou být důsledkem toxicity vůči biologickému materiálu.

Námi dosažené výsledky by mohly v budoucnu posloužit při aplikaci těchto rostlinných druhů ve fytoremediačních technologiích.

Výsledky laboratorních pokusů jasně naznačují význam fytoremediačních technologií, které lze úspěšně použít k odstranění kontaminantů z rozsáhlých zemědělských ploch. Do budoucna tyto metody představují šetrnou techniku pro odstranění polutantů z životního prostředí.

10. PŘÍLOHY

Seznam příloh:

- 1) Fytoextrakce piroxikamu rostlinami kukuřice seté a slunečnice roční

Tabulka 1: Časový průběh fytoextrakce piroxikamu rostlinami kukuřice

KUKUŘICE SETÁ HYBRID: DKC2971 - PIROXIKAM						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	15,70	10,67	5,58	1,13	0,49	13,5
2.	14,58	9,79	5,98	1,25	0,58	13,4
3.	13,78	10,79	9,41	3,20	2,44	10,7
4.	13,99	9,76	5,27	0,97	0,44	13,7
5.	16,47	9,23	3,82	0,58	0,36	14,9
6.	15,77	10,45	5,56	1,28	0,68	13,7
7.	12,96	11,72	7,61	2,40	1,86	11,3
8.	14,43	12,27	8,48	2,56	1,94	11,5
9.	15,44	12,36	7,57	1,41	0,70	12,3
10.	12,32	11,73	7,54	0,89	0,36	12,2
11.	11,34	10,92	5,88	1,33	0,69	12,3

Tabulka 2: Časový průběh fytoextrakce piroxikamu rostlinami slunečnice

SLUNEČNICE ROČNÍ HYBRID: BELEM - PIROXIKAM						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	14,52	12,90	9,23	7,93	6,21	9,6
2.	15,33	12,69	7,94	7,19	4,73	13,6
3.	15,23	13,65	9,84	9,82	7,25	8,5
4.	14,00	13,80	10,16	8,69	5,70	11,1
5.	15,35	14,39	10,95	9,06	7,04	8,9
6.	15,77	12,57	10,45	10,42	8,54	9,3
7.	17,44	13,63	10,83	9,77	6,53	8,2
8.	14,88	14,29	9,76	9,36	6,63	8,8
9.	14,08	11,68	10,08	8,79	6,01	13,3
10.	14,69	12,99	10,83	9,16	6,02	11,8
11.	14,97	12,44	9,09	4,94	2,92	13,4

2) Fytoextrakce ketoprofenu rostlinami kukuřice seté a slunečnice roční

Tabulka 3: Časový průběh fytoextrakce ketoprofenu rostlinami kukuřice

KUKUŘICE SETÁ HYBRID:DKC2971 - KETOPROFEN						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	11,31	3,92	0,81	0,17	-	14,5
2.	10,34	5,61	0,97	0,16	-	7,1
3.	11,12	4,06	0,72	0,12	-	12,7
4.	11,67	4,62	0,67	-	-	14,6
5.	11,60	4,35	0,54	0,10	-	14,2
6.	14,16	4,08	0,93	-	-	12,8
7.	11,20	3,34	0,69	0,10	-	9,6
8.	13,95	3,42	0,59	0,06	-	14,6
9.	13,22	4,26	0,65	0,12	0,07	16,1
10.	12,84	2,84	0,33	0,10	-	15,5
11.	10,88	7,78	3,25	3,13	2,02	14,0
12.	11,92	5,24	1,49	0,47	0,10	14,0
13.	13,66	3,81	0,56	0,15	-	14,1
14.	13,58	4,81	0,74	0,15	-	15,2

Tabulka 4: Časový průběh fytoextrakce ketoprofenu rostlinami slunečnice

SLUNEČNICE ROČNÍ HYBRID:BELEM - KETOPROFEN						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	14,62	5,72	1,47	0,18	-	16,8
2.	13,64	2,26	0,14	-	-	16,2
3.	15,48	1,02	0,20	-	-	13,9
4.	14,33	1,77	0,10	-	-	17,5
5.	15,16	1,49	-	-	-	17,1
6.	13,68	1,41	-	-	-	13,3
7.	14,18	0,47	-	-	-	18,2
8.	9,84	0,92	-	-	-	13,4
9.	14,19	0,89	-	-	-	13,5
10.	20,97	1,09	-	-	-	14,5

3) Fytoextrakce nimesulidu rostlinami kukuřice seté a slunečnice roční

Tabulka 5: Časový průběh fytoextrakce nimesulidu rostlinami kukuřice

KUKUŘICE SETÁ HYBRID:DKC2971 - NIMESULID						
Experiment	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	14,74	5,94	2,31	1,01	-	19,8
2.	16,04	6,61	2,46	1,65	0,23	18,8
3.	15,46	5,23	1,86	0,73	-	19,5
4.	13,78	3,52	1,24	-	-	22,6
5.	14,33	4,17	2,15	0,96	-	22,2
6.	14,03	3,99	2,06	0,44	-	19,7
7.	13,55	3,56	2,14	1,36	-	20,0
8.	15,43	4,16	3,02	1,72	0,84	17,3
9.	14,74	3,87	1,44	-	-	22,2
10.	14,77	3,74	1,79	0,38	-	21,8

Tabulka 6: Časový průběh fytoextrakce nimesulidu rostlinami slunečnice

SLUNEČNICE ROČNÍ HYBRID:BELEM - NIMESULID						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	13,72	4,73	1,06	-	-	12,8
2.	15,15	6,29	1,21	0,38	-	9,8
3.	14,12	4,21	0,98	-	-	12,2
4.	12,22	5,17	1,31	0,52	-	10,7
5.	14,04	3,69	1,46	0,23	-	10,3
6.	14,58	3,75	1,04	-	-	11,7
7.	13,96	3,22	0,85	-	-	13,0
8.	14,81	4,15	1,67	0,45	-	9,7
9.	13,65	3,19	0,92	-	-	12,4
10.	15,24	5,99	1,63	0,39	-	9,5

4) Fytoextrakce paracetamolu rostlinami kukuřice seté a slunečnice roční

Tabulka 7: Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami kukuřice

KUKUŘICE SETÁ HYBRID:DKC2971 - PARACETAMOL						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	13,41	8,30	8,18	7,54	5,85	14,0
2.	12,70	7,79	9,08	7,28	4,99	11,2
3.	13,89	10,41	5,99	4,60	3,13	11,7
4.	13,75	9,86	6,36	3,59	2,35	14,2
5.	14,11	9,84	8,87	5,53	4,63	14,6
6.	13,45	9,38	9,44	7,68	4,89	13,6
7.	14,77	5,29	5,32	3,43	1,88	15,5
8.	15,03	9,18	7,93	3,70	3,11	13,1
9.	12,54	8,78	3,98	1,86	0,66	14,8
10.	14,73	10,17	7,36	4,95	3,47	13,9
11.	12,81	10,91	7,84	5,07	2,05	13,2
12.	15,10	9,58	6,72	7,15	3,50	14,5
13.	13,70	12,87	12,87	6,68	4,87	14,1

Tabulka 8: Časový průběh fytoextrakce paracetamolu rostlinami slunečnice

SLUNEČNICE ROČNÍ HYBRID:BELEM - PARACETAMOL						
Experiment	Výchozí koncentrace 0 h [mg/l]	Koncentrace v čase t (odběr)				Hmotnost rostliny [g]
		24 h	48 h	72 h	96 h	
1.	13,70	13,69	13,07	9,55	7,14	10,7
2.	14,76	14,74	14,14	10,09	5,82	9,8
3.	12,56	12,31	14,68	11,84	7,46	9,2
4.	14,02	15,03	14,14	9,70	6,26	10,9
5.	10,74	9,87	9,13	8,13	7,71	9,4
6.	13,15	9,30	10,87	9,88	8,64	9,8
7.	13,01	12,50	9,38	8,85	5,33	10,5
8.	15,24	11,82	9,91	7,34	5,98	9,5
9.	16,18	11,91	13,16	10,57	6,01	8,7
10.	14,74	12,45	11,51	7,91	5,09	8,8
11.	14,96	12,37	10,90	8,57	5,77	8,7
12.	15,35	11,95	11,04	7,12	4,29	10,0
13.	13,38	9,57	8,62	6,94	4,26	9,6
14.	14,01	10,14	9,44	7,31	4,55	9,9

5) Slunečnice roční a kukuřice setá



Obrázek 10: Slunečnice roční



Obrázek 11: Kukuřice setá

(zdroj: www.agroatlas.spb.ru/cultural)

6) *In vitro* kultury slunečnice roční a kukuřice seté



Obrázek 12: Slunečnice roční



Obrázek 13: Kukuřice setá

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hampl F.; Rádl S.; Paleček J.: Farmakochemie, vydavatelství VŠCHT Praha, 2007, ISBN 978-80-7080-639-5
- [2] Hynie S.: Speciální farmakologie – Díl 2. Autakoidy a látky ovlivňující bolest, nakladatelství Karolinum, 1998, ISBN 80-7184-717-8
- [3] Bioremediační technologie k odstranění polychlorovaných bifenyly ze životního prostředí, R-T & Úvodní národní inventura POPs v ČR Část VII – Technologie a biotechnologie, 1993, 75-101
- [4] Dercová K.; Makovnicková J.; Barančíková B.; Žuffa J.: Bioremediace toxických kovů kontaminujících vody a pody, 2005, Chemické Listy 99, 682-693
- [5] Soudek P.: Co je fytoředění?, 2008, Dostupné na:
<http://www.rozhlas.cz/priroda/zivotniprostredi>
- [6] Melenová I.; Demnerová K.: Nové možnosti odstraňování polutantů ze životního prostředí a využití multifunkčního permeabilního bariérového systému – multibariéry, 2004, Chemické Listy 98, 908-915
- [7] Vaněk T.; Soudek P.; Tykva R.; Kališová I.: Možnosti využití fytoředění pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidy, Dostupné na:
http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07/P_07.htm
- [8] Phytoremediation resource guide. 1999, United States Environmental Protection Agency – EPA, 1-30, [Cit. dne 16. 3. 2012]
- [9] Soudek P.; Petrová Š.; Benešová D.; Kotyza J.; Vaněk T.: Fytoředění a možnosti zvýšení jejich účinnosti, 2008, Chemické Listy 102, 346-352
- [10] Kolektiv autorů, Kompendium sanačních technologií, Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o Chrudim, 2006, ISBN 80-86832-15-5
- [11] Kučerová P.; Macková M.; Macek T.: Perspektivy fytoředění při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí, 1999, Chemické Listy 93, 19-26
- [12] Chromá L.; Macková M.; Macek T.; Martínek V.; Stiborová M.: Rostlinné cytochromy P 450 a peroxydasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, 2001, Chemické Listy 95, 212-222
- [13] Fendrich Z. a kolektiv autorů: Farmakologie pro farmaceuty III., nakladatelství Karolinum, 2007, ISBN 978-80-246-1419-9
- [14] Stone T.; Darlingtonová G.: Léky, drogy, jedy; 2000, ISBN 80-200-1065-3

- [15] Kotyza J.; Soudek P.; Kafka Z.; Vaněk T.: Léčiva - „nový“ enviromentální polutant, 2009, Chemické Listy 103, 540-547
- [16] Šídlová P.; Podlipná R. Vaněk T.: Cytostatická léčiva v životním prostředí, 2011, Chemické Listy 105, 8-14
- [17] Macková M.; Macek T.: Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí, 2005, Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, 1-29
- [18] Fent K.; Wetson A.; Caminada D.: Ecotoxicology of human pharmaceuticals, 2006, Aquatic Toxicology 76, 122-156
- [19] www.sukl.cz ; Státní ústav pro kontrolu léčiv, [cit. 28.4.2012]
- [20] Hynie S.: Farmakologie v kostce, Triton, 2001, 191-262, ISBN 80-7254-181-1
- [21] Murashige T.; Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, Physiologia Plantarum, 1962, 473-496
- [22] Marek J. a kolektiv autorů: Farmakoterapie vnitřních nemocí, 2010, Grada Publishning a.s., 674-676, ISBN 978-80-247-2639-7
- [23] Jabor A. a kolektiv: Vnitřní prostředí, nakladatelství Grada Publishning a.s., 2008, 385-387, ISBN 978-80-247-1221-7
- [24] Lincová D.; Farghati H. et al.: Základní aplikovaná farmakologie, nakladatelství Galén, 2007, 285-312, ISBN 978-80-7262-373-0
- [25] Tack G.; Vervaeke P.; Vandecasteele B.: Phytoremediation/stabilisation of dredged sediment derived soils with willow, 2005, Geo Geophysical Research Abstracts Vol.7, 1-4
- [26] Vrána B., Dercová K., Baláž Š., Tandlich R.: Biosorpcia hydrofóbných organických polutantov., 1998, Chemické Listy 92: 186-196
- [27] Murray R.; Granner D.; Mayes P.; Rodwell V.: Harper's Biochemistry, Appleton and lange, a Publishning Division of Prentice-Hall International Inc.; ISBN 80-7319-013-3
- [28] ITRC-Phytotechnology and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised., Interstate technology and regulatory Cooperation, 2009, na: <http://www.cluin.org/download/remed/>
- [29] ITRC Phytotechnology and Regulatory Guidance Document., Interstate technology and regulatory Cooperation, 2001, Dostupné na: <http://www.cluin.org/download/remed/>

- [30] Tan H.; Ong C.; Lai H.; Chow C.: Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure, 2007, Singapore Med J, 486-583
- [31] Atlas of Economic Plants and Pests of Russia and Neighboring Countries; The Former Soviet; dostupné na: <http://www.agroatlas.spb.ru/cultural/>; [cit. 6.5.2012]
- [32] Kuemmerer K.; Pharmaceuticals in the Environment, 2008, ISBN 978-3-540-74663-8
- [33] Masár O.: Nesteroidní analgetika, 2004, Neurologie pro praxi 5, 1-5